

# EUROPEAN PATENT OFFICE

## Patent Abstracts of Japan

PUBLICATION NUMBER : 2000060571  
PUBLICATION DATE : 29-02-00

APPLICATION DATE : 20-08-98  
APPLICATION NUMBER : 10249064

APPLICANT : MITSUBISHI CHEMICALS CORP;

INVENTOR : NAGAI KATSUTAKA;

INT.CL. : C12N 15/09 C07K 14/47 C07K 16/18  
C12N 5/10 C12N 9/12 C12Q 1/02 //  
C12P 21/08 (C12N 15/09 , C12R  
1:91 ), (C12N 9/12 , C12R 1:91 )

TITLE : NEW MAMMALIAN PEPTIDE AND  
POLYNUCLEOTIDE ENCODING THE  
SAME

```

Met Ser Val Gly Cys Pro Glu Pro Glu Pro Leu His Ser Leu Pro Cys
 1           5           10           15
Cys Gly Pro Gly Ala Ala Pro Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Leu Leu
          20           25           30
Thr Glu Asp Met Gln Ala Leu Thr Leu Arg Thr Leu Ala Ala Ser Asp
          35           40           45
|
|
|
|
Ala Gly Leu Ala Pro Pro Ala Pro Pro Gly Arg Thr Asp Gly Arg Ala
385           390           395           400
Asp Lys Ser Lys Gly Gln Val Val Leu Ala Thr Ala Ile Glu Ile Cys
          405           410           415
Val
  
```

ABSTRACT : PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain the subject new peptide having a specific amino acid sequence and phosphorylase activity, playing some role in the construction of the brain and useful e.g. for the elucidation of the cranial nervous function, elucidation of the pathological mechanism of cranial nervous system disorders and the diagnosis and treatment of the disorders.

SOLUTION: This new mammalian peptide is such one as to have an amino acid sequence of the formula or an amino acid sequence wherein one or plural amino acid(s) is (are) deleted, substituted or inserted in the amino acid sequence of the formula and to have phosphorylase activity and probably to play some role in the construction of the brain because of its most abundant amount in the brain and the much expression in the fetal period, therefore, to be useful e.g. for the elucidation of the nervous function, the elucidation of the pathological mechanism of the cranial nervous system disorders and the diagnosis and treatment of the disorders. The peptide is obtained by cloning a cDNA library acquired by the reverse transcription of poly(A)+RNA derived from the rat brain through the amplification of the library according to PCR technique using a synthesized primer having a partial base sequence of the library.

COPYRIGHT: (C)2000,JPO



(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開2000-60571

(P2000-60571A)

(43)公開日 平成12年2月29日(2000.2.29)

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	FI	テーマコード(参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A 4 B 0 2 4
C 0 7 K 14/47		C 0 7 K 14/47	4 B 0 5 0
16/18		16/18	4 B 0 6 3
C 1 2 N 5/10		C 1 2 N 9/12	4 B 0 6 4
9/12		C 1 2 Q 1/02	4 B 0 6 5

審査請求 未請求 請求項の数25 FD (全 15 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平10-249064

(22)出願日 平成10年8月20日(1998.8.20)

(71)出願人 000005968

三菱化学株式会社

東京都千代田区丸の内二丁目5番2号

(72)発明者 奈良 清光

東京都町田市南大谷11号 株式会社三菱化  
学生命科学研究所内

(72)発明者 赤迫 優子

東京都町田市南大谷11号 株式会社三菱化  
学生命科学研究所内

(74)代理人 100103997

弁理士 長谷川 曉司

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 新規な哺乳類のペプチド及びそれをコードするポリヌクレオチド

(57)【要約】

【課題】 リン酸化酵素活性を有する新規な哺乳類ペプチドの提供。

【解決手段】 ラット脳の調子に存在する、糖鎖情報伝達に関与するリン酸化酵素タンパク質の遺伝子をクローニングして、そのDNA配列及びそれより推定されるアミノ酸配列を決定した。該遺伝子を動物細胞中で発現して該タンパク質の生成を確認した。また、該タンパク質に対する抗体を作成した。

【効果】 本発明のタンパク質は、脳に最も多く存在し、胎児期に多く発現していることから、脳の構築に何らかの役割を果たしていると考えられるので、脳神経系疾患の治療・診断等に有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号：2で表されるアミノ酸配列または該アミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が欠失、置換もしくは挿入したアミノ酸配列を含有する哺乳類ペプチド。

【請求項2】 配列番号：2で表されるアミノ酸配列または該アミノ酸配列において1～数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは挿入したアミノ酸配列を含有する請求項1記載の哺乳類ペプチド。

【請求項3】 哺乳類がラットである請求項1記載のペプチド

【請求項4】 哺乳類がマウスである請求項1記載のペプチド

【請求項5】 哺乳類がヒトである請求項1記載のペプチド

【請求項6】 配列番号：2で表されるアミノ酸配列を有する請求項1または2記載のペプチド。

【請求項7】 リン酸化酵素活性を有する請求項1または2記載のペプチド

【請求項8】 セリンスレオニンリン酸化酵素活性を有する請求項7記載のペプチド。

【請求項9】 フロリンリッチな配列PPXPを有し、SH3ドメインに結合するキナーゼである請求項8記載のペプチド

【請求項10】 配列番号：2で表されるアミノ酸配列を含有するペプチドをコードするポリヌクレオチドの少なくとも80%の同一性を有する単離ポリヌクレオチド

【請求項11】 請求項1または2記載のペプチドをコードする単離ポリヌクレオチド。

【請求項12】 ポリヌクレオチドがDNAである請求項10または11記載のポリヌクレオチド

【請求項13】 配列番号：1の塩基番号205～1455で表されるDNA配列を有する請求項11記載の単離ポリヌクレオチド。

【請求項14】 遺伝コードの縮重により、配列番号：2のアミノ酸と同じアミノ酸をコードしている単離ポリヌクレオチド。

【請求項15】 配列番号：1で表される塩基配列を有する請求項12記載の単離DNA。

【請求項16】 請求項12記載のDNAを含有する組換えベクター。

【請求項17】 請求項16記載の組換えベクターを含む宿主細胞。

【請求項18】 請求項17記載の宿主細胞を培養し、請求項12記載のDNAを発現させて、請求項1または2記載のペプチドを産生させることを特徴とする請求項1または2記載のペプチドの製造法。

【請求項19】 請求項1または2記載のペプチドを含有する医薬。

【請求項20】 請求項11記載のポリヌクレオチドを含有する医薬。

【請求項21】 請求項1または2記載のペプチドに対する抗体。

【請求項22】 モノクローナル抗体である請求項21記載の抗体。

【請求項23】 ポリクローナル抗体である請求項21記載の抗体。

【請求項24】 請求項1または2記載のペプチドの発現に関連した疾病の診断方法であって、該ペプチドの変異体をコードしているポリヌクレオチド中の変異を検出することを特徴とする診断方法。

【請求項25】 請求項1または2記載のペプチドと相互作用し、その活性を阻害または活性化する化合物を同定する方法であって、スクリーニングしようとする化合物が該ペプチドと相互作用する条件下、ペプチドを含む組成物と該化合物とを接触させ、該化合物の相互作用から生じるシグナルの有無を検出して、請求項1または2記載のペプチドの活性を阻害または活性化する化合物を同定する方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、新規な生理活性を有する哺乳類のタンパク質、特にセリンスレオニンリン酸化酵素活性などリン酸化酵素活性を有するペプチドに関する。

【0002】

【従来の技術】脳では、様々なリン酸化酵素が働き、記憶、神経細胞やグリア細胞の増殖・突起伸展・神経回路網の構築等に重要な役割を果たしている。最近、糖鎖の情報伝達にリン酸化が関与していることが明らかになっている。また、これらに関係するリン酸化酵素が異常になると脳腫瘍、痴呆等の病態を示すことが知られている。そのため新しいリン酸化酵素を発見し、それらの性状を調べることによって神経機能を解明したり、神経疾患における病態メカニズムを解明、診断、治療しようとする試みがなされている。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、有用な生理活性を有する新規なペプチド、該ペプチドをコードするDNAなどのポリヌクレオチド、該DNAを含有する組換えベクター、該組換えベクターを含有する宿主、該ペプチドの組換えDNA技術による製造法、該ペプチドに対する抗体、該ペプチドあるいは該ポリヌクレオチドを含有する医薬、該ペプチドをコードしているDNA中の変異を検出する、該ペプチドに関連した疾患の診断法、該ペプチドを活性化または阻害する化合物の同定法に関する。

【0004】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記した

課題を解決すべく、鋭意検討を行った結果、ラット脳の海馬に存在する、リン酸化酵素の遺伝子をPCR法を用いて増幅後クローニングし、該遺伝子をコードするポリヌクレオチド配列を決定して、それより演繹されるアミノ酸配列を決定するとともに、該遺伝子を発現させて、該タンパク質の生成を確認して、本発明を完成するに至った。

【0005】すなわち、本発明は、(1) 配列番号：2で表されるアミノ酸配列または該アミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が欠失、置換もしくは挿入したアミノ酸配列を含有する哺乳類ペプチド、(2) 配列番号：2で表されるアミノ酸配列または該アミノ酸配列において1～数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは挿入したアミノ酸配列を含有する1項の哺乳類ペプチド、(3) 哺乳類がラットである1項記載のペプチド、

【0006】(4) 哺乳類がマウスである1項記載のペプチド、(5) 哺乳類がヒトである1項記載のペプチド、(6) 配列番号：2で表されるアミノ酸配列を有する1または2項記載のペプチド、(7) リン酸化酵素活性を有する1または2項記載のペプチド、(8) セリンスレオニンリン酸化酵素活性を有する7項記載のペプチド、(9) フロリンリッチな配列PPXPを有し、SH3ドメインに結合するキナーゼである8項記載のペプチド、

【0007】(10) 配列番号：2で表されるアミノ酸配列を含有するペプチドをコードするポリヌクレオチドの少なくとも80%の同一性を有する単離ポリヌクレオチド、(11) 1または2項記載のペプチドをコードする単離ポリヌクレオチド、(12) ポリヌクレオチドがDNAである10項または11項記載のポリヌクレオチド、(13) 配列番号：1の塩基番号205～1455で表されるDNA配列を有する11項記載のポリヌクレオチド、(14) 遺伝コードの縮重により、配列番号：2のアミノ酸と同じアミノ酸をコードしている単離ポリヌクレオチド、

【0008】(15) 配列番号：1で表される塩基配列を有する12項記載の単離DNA、(16) 12項記載のDNAを含有する組換えベクター、(17) 16項記載の組換えベクターを含む宿主細胞、(18) 17項記載の宿主細胞を培養し、12項記載のDNAを発現させて、1または2項記載のペプチドを産生させることを特徴とする1または2項記載のペプチドの製造法、(19) 1または2項記載のペプチドを含有する医薬、(20) 11項記載のポリヌクレオチドを含有する医薬、

【0009】(21) 1または2項記載のペプチドに対する抗体、(22) モノクローナル抗体である21項記載の抗体、(23) ポリクローナル抗体である21項記載の抗体、(24) 1または2項記載のペプチドの発現に関連した疾病の診断方法であって、該ペプチドの変異体をコードしているポリヌクレオチド中の変異を検出す

ることを特徴とする診断方法、

【0010】(25) 1または2項記載のペプチドと相互作用し、その活性を阻害または活性化する化合物を同定する方法であって、スクリーニングしようとする化合物が該ペプチドと相互作用する条件下、ペプチドを含む組成物と該化合物とを接触させ、該化合物の相互作用から生じるシグナルの有無を検出して、1または2項記載のペプチドの活性を阻害または活性化する化合物を同定する方法を提供する。

【0011】本発明のペプチドは、配列番号：2で表されるアミノ酸配列と同一又は実質的に同一のアミノ酸配列を有するペプチドである。配列番号：2で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有するペプチドとは、配列番号：2のアミノ酸配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の同一性を有し、配列番号：2に記載のペプチドと同様な活性を有する。このような活性としては、例えばセリンスレオニンリン酸化酵素活性などのリン酸化酵素活性(キナーゼ活性)が挙げられる。その活性の程度は、ペプチドのアミノ酸配列によって変わり得るが、そのような生物活性が有用性を有する限りにおいては、アミノ酸配列は変わり得る。

【0012】具体的には、本発明のペプチドは、配列番号：2のアミノ酸配列において1～複数個、好ましくは1～10個、さらに好ましくは1～5個、さらには1, 2, 3又は4個のアミノ酸が欠失、置換もしくは挿入したアミノ酸配列を有するペプチドのフラグメント、アナログを包含する。該フラグメントおよびアナログは、本発明のペプチドの機能にとって重要でない部位のアミノ酸を欠失、置換もしくは挿入して得られる。ペプチドの機能にとって重要な部位のアミノ酸は、置換することはできない。その他、その生物学的活性と関連してペプチド全体の形の保存に関与している部位もアミノ酸の欠失、置換もしくは挿入によって変化させることは不可能である。置換可能なアミノ酸は、同様なサイズあるいは極性を持ったものである。このような例として、脂肪族アミノ酸Ala, Val, Leu及びIle間での相互置換、水酸基を有するSer及びThr間の相互置換、酸性残基を有するAsp及びGlu間での相互置換、アミド残基を有するAsn及びGlnの間の置換、塩基性残基を有するLys及びArgの間の置換、芳香族残基を有するPhe及びTyr間の置換が挙げられる。

【0013】本発明のペプチドの前駆体も、上記した生理活性を有する限り本発明のペプチドに包含される。このような前駆体としては、本発明のペプチドのN末端側および(または)C末端側に、1以上のアミノ酸が付加したもの等が挙げられる。さらに、本発明のペプチドは、半減期を延長させるためにポリエチレングリコールに結合させたり、分泌のために分泌配列あるいはリーダー配列に結合させたり、さらには精製の目的で融合ペプ

チドとして産生させることができる。本発明のペプチドあるいはその前駆体の生理学的に許容される酸附加塩も本発明に含まれる。このような酸附加塩としては、塩酸、リン酸、硫酸等の無機酸との塩、酢酸、ギ酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、クエン酸、酒石酸、リンゴ酸、安息香酸、ベンゼンスルホン酸等の有機酸との塩が挙げられる。

【0014】本発明のペプチド及びポリヌクレオチドは、単離された形態にあり、また好ましくは均一の程度にまで精製されている。本発明のポリヌクレオチドは、配列番号：2で表されるアミノ酸配列を含有するペプチドをコードするポリヌクレオチド（配列番号：1の塩基番号205～1155）の少なくとも80%の同一性を有するものと及びそれに相補的なものが好ましい。更に、90%同一であるポリヌクレオチドが好ましく、特に95%以上同一のものが最も好ましい。95%以上、好ましくは97%以上同一の配列を有するポリヌクレオチドは、厳密な条件下でも上記配列番号：2のポリヌクレオチドとハイブリダイズする。

【0015】本発明のペプチドの構造的または機能的特性によって特徴づけられるフラグメントも有用である。本発明のペプチドは全長117アミノ酸からなり、セリンシレオニンキナーゼに特徴的な配列およびプロリンリッチな配列PPXP配列を有する、SH3ドメインに結合するキナーゼであるので、このような有用なフラグメントとしては、セリンシレオニンキナーゼに特徴的な配列、プロリンリッチな配列PPXP配列を有するフラグメントが挙げられる。さらに、本発明は、上記したフラグメントをコードするポリヌクレオチドを包含する。このようなポリヌクレオチドフラグメント及び該フラグメントをコードしているポリヌクレオチドにハイブリダイズするポリヌクレオチドは、PCR用のプライマーとしてあるいは本発明のペプチドをコードするDNAを検出するためのプローブとしても有用である。

【0016】

【発明の実施の態様】本発明のペプチドをコードするDNAは、例えばラット脳由来のポリ(A)+RNAの逆転写で得られるcDNAライブラリーからクローニングできる。具体的には、本発明のペプチドをコードするDNAの部分塩基配列を有する合成DNAプライマーを用いて、PCR法により上記ラット海馬cDNAライブラリー等から目的とするDNAを増幅し、これをベクター中にサブクローニングする。新規なクローンを選択し、そのDNA配列を決定する。この配列に基づいて合成したプライマーを用いて全長のcDNAをクローニングする。

【0017】その他、適当なベクターに組み込んだDNAから本発明のペプチド（タンパク質）の一部または全領域をコードするDNA断片あるいは合成オリゴヌクレオチドを標識したものをプローブとして、本発明のペプ

チドをコードするDNAをクローニングすることができる。細胞からのポリ(A)+RNAの調製は、まず全RNAを抽出し、次いで該全RNAからオリゴ(dT)セルロース等のポリ(A)+RNA精製用担体を用いて精製する方法等により実施できる。全RNAの調製方法としては、グアニジンチオシアネート・フェノール法、グアニジンチオシアネート・トリフルオロセシウム法、アルカリ蔗糖密度勾配遠心分離法、グアニジンチオシアネートおよび塩化セシウムを用いる方法等が好適である。

【0018】上述のようにして得られたポリ(A)+RNAを鋳型にして、例えば、6塩基ランダムオリゴヌクレオチドをプライマーとして、逆転写酵素により一本鎖cDNAを合成し、次いでDNAポリメラーゼにより二本鎖cDNAを合成する。得られる約200bpのDNAを制限酵素EcoRI及びXhoIで切断し、pBluescript IISKベクターにサブクローニングし、得られたDNAを大腸菌に形質転換する。大腸菌の形質転換はハナハンの方法(J.Mol. Biol. 166, 557-580)を用いて効率よく実施できる。得られる100個のクローンからプラスミドDNAをminiprepプラスミド精製法(Sambrook等, MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL, 2nd Ed; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989) 1.25参照)で精製し、DNA配列を決定すると、新規な1個のクローンが選択される。このクローンの配列に基づいて合成したプライマーを用いて、全長cDNAが合成される。

【0019】配列番号：2で表されるアミノ酸配列において、1もしくは数個(1～数個)のアミノ酸が欠失、置換もしくは挿入したアミノ酸配列を含有する本発明の欠失型、置換型及び挿入型変異体をコードするポリヌクレオチドは、配列番号：2で表されるアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドから公知のin vitro突然変異誘発により容易に合成できる。公知のキット、例えば、MutantTM-K(宝酒造(株)、MutantTM-G(宝酒造(株))を用いて、配列番号：2で表されるアミノ酸配列において、1～数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは挿入したアミノ酸配列を含有する本発明の欠失型、置換型及び挿入型変異体をコードするポリヌクレオチドを容易に調製できる。また、発現した配列番号：2で表されるアミノ酸配列のペプチドの変異体が有するリン酸酵素活性は容易に検出可能であり、本発明に含まれるペプチドの範囲は容易に決定可能である。

【0020】本発明のポリヌクレオチドを含有する組換えベクターは、本発明のペプチドの産生に使用される。本発明のベクターとしては、宿主細胞中でのポリヌクレオチドの維持、増殖または発現に適したものが使用される。本発明のペプチドをコードするクローン化されたD

NAは、そのまま、あるいは制限酵素で消化したり、リンカーに付加してベクター中に挿入される。該DNAは、その5'末端側に翻訳開始コドン(ATG)を有し、また3'末端側に翻訳終止コドン(TAA, TGAまたはTAG)を有する。該DNAは、発現ベクター中のプロモーターの下流に位置する。このようなベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド(pBR322, pUC13等)、枯草菌由来のプラスミド(pUB110, pC194)、ストレプトミセス属菌由来のプラスミド、サルモネラ属菌由来のプラスミド等のプラスミド、酵母エビソームや宿主染色体エレメント由来のプラスミド、YCp型プラスミド、pYAC型プラスミド等、スファージなどのバクテリオファージ、バクテリオファージ、アデノウイルス、レトロウイルス、パキスロウイルスなどのウイルス由来のベクター等が使用されるが、これらのベクターの多くは市販されている。

【0021】組換えベクター中のDNA配列は、適当な発現制御配列(プロモーター)に作動可能なように連結される。このようなプロモーターとしては、ファージλ P<sub>1</sub>プロモーター、T<sub>7</sub>プロモーター、大腸菌のlac, trp, p<sub>pp</sub>およびlacZプロモーター、バチルス属菌のSP01プロモーター、penPプロモーター、酵母のPH05プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHI1プロモーター、SUC2プロモーター、GAL1プロモーター、Mf $\alpha$ プロモーター、昆虫細胞の多角体プロモーター、P10プロモーター、動物細胞用のSV40初期及び後期プロモーター、レトロウイルスのLTRプロモーター、CMVプロモーター、HSV-TKプロモーター、メタヒナオネインプロモーター、植物細胞用の35Sプロモーター、イネアクチン遺伝子プロモーター等が挙げられる。組換えベクターは、転写されるDNA領域、転写開始及び転写終止のシグナル配列と1以上の遺伝子を含む。

【0022】一般に、発現ベクターは、リプレッサー結合部位及びエンハンサーなどにより作動する発現制御領域を含む。その他、発現ベクターは、選択マーカーを含有する。好適なマーカーは真核細胞用のジヒドロ葉酸レタクターゼ(dhfr)遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、細菌用のテトラサイクリンまたはアンピシリン耐性遺伝子等である。dhfr遺伝子は、メソトレキセート耐性を形質転換細胞に付与し、また、ネオマイシン耐性遺伝子は、G41S耐性を形質転換細胞に付与する。dhfr遺伝子欠損CHO細胞を宿主とし、dhfr遺伝子を選択マーカーとする場合には、チミジンを含まない培地中で形質転換体を選択できる。この場合、メソトレキセート(MTX)濃度を徐々に上げて培養し、耐性株を選択することにより、dhfr遺伝子と同時に本発明のペプチドをコードするDNAが細胞内で増幅され、高発現のCHO(dhfr<sup>-</sup>)細胞が得られる。

【0023】本発明の組換えベクターは、必要に応じて

て、シグナル配列をペプチドのN末端側に付加するように構築される。このようなシグナル配列は、大腸菌宿主の場合には、PhoA, OmpA等のシグナル配列であり、酵母宿主の場合には、Mf $\alpha$ 、SUC2シグナル配列等であり、動物細胞宿主の場合には、 $\alpha$ -インターフェロンシグナル配列等である。本発明は、また上記組換えベクターを含む宿主細胞に関する。宿主細胞は、哺乳動物細胞、植物細胞、昆虫細胞、酵母細胞、アスペルギウス属菌などの真核細胞、細菌細胞などの原核細胞である。リン酸カルシウムトランスフェクション、エレクトロポレーション、形質導入、感染その他の方法により本発明の組換えベクターは宿主細胞に導入される。

【0024】上記したプロモーターの制御下、上記した哺乳動物細胞、酵母、細菌等の宿主において本発明のペプチドを発現できる。原核宿主の例は、大腸菌、枯草菌、サルモネラ菌、シュドモナス、ストレプトミセス、スタフィロコッカス等である。酵母としては、サッカロマイセス・セレビシエ、シズサッカロマイセス・ポンベ、ピキア・パストリス等が挙げられる。

【0025】形質転換した原核宿主は増殖され、誘導可能なプロモーターを含むベクターの場合には、温度あるいは化学誘導物質により誘導し、該細胞を炭素源(グルコース、デキストラン、可溶性澱粉等)、窒素源(アンモニウム塩、硝酸塩類、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕等)及び無機物(塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウム等)を含有する液体培地中、適当なpH(pH約5~8)で適当な時間(約3~24時間)培養する。適当な培養温度は、大腸菌については、約14~43℃、バチルス属菌の場合には、約30~40℃である。培養後、細胞を物理的あるいは化学的方法で破壊し、得られる粗抽質物から、本発明のペプチドが精製される。

【0026】形質転換された酵母は、最小培地等の培地中で、pH約5~8、温度約20~35℃で約24~72時間培養される。昆虫細胞としては、AcNPV(Autographa californica NPV)をウイルスとする場合には、Sf細胞、MG1細胞等が使用され、またカイコ多核体病ウイルス(BmPV)をウイルスとする場合には、カイコ幼虫及びカイコ培養細胞(BM-N細胞)等が使用される。カイコ細胞は、10%熱不活性化ウシ胎仔血清を含むTC-10培地等を用い、約27℃でコンフルエントにした後、継代培養される。

【0027】哺乳動物細胞の例は、COS-7細胞、マウスAtT-20細胞、ラットGH3細胞、ラットMtT細胞、マウスMIN6細胞、Vero細胞、C127細胞、CHO細胞、dhfr遺伝子欠損CHO細胞、HEL $\alpha$ 細胞、L細胞、BHK細胞、BALB3T3細胞、293細胞、ボウス黒色腫細胞等である。哺乳動物細胞発現ベクターは、複製起点、プロモーター(上記SV

40初期及び後期プロモータ、レトロウイルスのLTRプロモータ、CMVプロモータ、HSV-TKプロモータ、メタロチオネインプロモータ等)、エンハンサー(SV40エンハンサー、アデノウイルスエンハンサー、サイトメガロウイルス初期プロモーター等)、選択マーカー(上記dhfr遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子等)、リボソーム結合部位、ポリアデニル化部位(SV40ポリアデニル化部位等)、スプライスドナー及びアクセプター部位(SV40スプライス部位由来のDNA配列)、転写終結配列及び5'非転写配列を含む。

【0028】このようなベクターとして、プラスミドベクター、1本鎖もしくは2本鎖ファージベクター、1本鎖もしくは2本鎖のRNAもしくはDNAウイルスベクター等が使用される。形質転換哺乳動物細胞の培養には、約5～20%の胎児牛血清を含むMEM培地、DMEM培地、RPMI 1640培地等が使用され、pH約6～8、温度約30～40℃で約15～72時間培養が行われる。

【0029】植物細胞に本発明のペプチドをコードする遺伝子を導入するには、*Agrobacterium tumefaciens*に存在するTiプラスミドが使用される。外来の遺伝子は、TiプラスミドのT-DNAの両末端の25bpの繰り返し配列内に挿入される。

*A. rhizogenes*のRiプラスミドも同様に使用できる。T-DNAが植物細胞内に導入されるに際しては、vir領域と呼ばれる遺伝子群が重要である。活性化されたvir遺伝子によってT-DNAから一本鎖DNA(T-ストランド)が生じ、該遺伝子は植物細胞内の染色体に組み込まれる。目的の遺伝子は、共存組み込みによりTiプラスミドに導入できる。その他、T-DNAとvir領域とが別々のプラスミド上に存在しているバイナリー方式により、アグロバクテリウムにTiプラスミドを導入できる。次いで、目的遺伝子を含むアグロバクテリウムを植物に感染させ、該遺伝子を植物に導入する。

【0030】哺乳動物細胞を宿主とした場合、硫酸アンモニウムまたはエタノール沈殿、酸抽出、アニオンまたはカチオン交換クロマトグラフィ、疎水性相互作用クロマトグラフィ等により本発明のペプチドを組換え細胞培養物から回収、精製できる。本発明のペプチドはグリコシル化されていなくてもよい。また、宿主次第では、N末端にメチオニンを有するペプチドが得られる。上記した組換えDNA技術による、本発明のペプチドの産生についての詳細は、Sambrook等、MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL, 2nd Ed; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989)に記載されている。

【0031】本発明のペプチドに対するモノクローナル

抗体産生のために、本発明のペプチドは、担体及び希釈剤とともにマウス及びラット等の温血動物に投与される。抗体産生能を高めるために、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを同時に投与するのが好ましい。通常2～6週毎に1回ずつ、合計2回から10回程度ペプチドが投与される。モノクローナル抗体産生細胞作成に際しては、抗原を免疫した温血動物から抗体価の認められた個体を選択し、最終免疫の2～5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髓腫細胞と融合させることによりモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製できる。上記した細胞融合操作は、Kohler and Milstein, Nature, 256, 495 (1975)に従って実施できる。融合促進剤としては、ポリエチレングリコール(PEG)が好ましく、また骨髓腫細胞としては、P3U1が好ましい。使用される抗体産生脾臓細胞数と骨髓腫細胞数との比は、1:1～20:1の範囲が好ましく、PEGは、10～80%程度の濃度で添加され、30～37℃で1～10分間インキュベートすることにより効率よく融合細胞が得られる。モノクローナル抗体産生ハイブリドーマのスクリーニング及びモノクローナル抗体の精製は公知の方法に従って実施できる。

【0032】本発明のモノクローナル抗体には、キメラ抗体、1本鎖抗体、ヒト化抗体、Fabフラグメントなども含まれる。また、ポリクローナル抗体も公知の方法に従って作成できる。すなわち、本発明のペプチドとキャリアタンパク質との複合体を作成し、上記したモノクローナル抗体の場合と同様にして温血動物を免疫し、公知の方法で抗体を分離精製する。本発明のペプチドは、脳内での情報伝達に関与すると考えられるので、脳神経系疾患の治療に使用し得る。また、本発明のペプチドを活性化する物質は、神経活動の維持、活性化に有用であると考えられる。

【0033】本発明のペプチドを活性化する化合物は、以下のようにして同定できる。すなわち、スクリーニングしようとする化合物と本発明のペプチドとが相互作用できる条件下、該候補化合物と本願発明のペプチドとの相互作用に応じて検出可能なシグナルを提供できる第2の成分の存在下、該候補化合物と本願発明のペプチドとを相互作用させて、該相互作用から生じるシグナルの有無を検出して、該候補化合物が本願発明のペプチドの活性を阻害または活性化するかを決定する。

【0034】治療上有効量の本発明のペプチドを、該ペプチドを必要としている個体に投与して該個体を治療することができる。

【0035】また、本発明のペプチドの活性または発現を阻害するアンタゴニストの有効量を、該ペプチドの阻害を必要としている個体に投与することにより該個体を治療することができる。このようなアンタゴニストとしては、本発明のペプチドに対するモノクローナル抗体あ



るいはポリクローナル抗体、さらには本発明のペプチドの遺伝子の発現を阻害するオリゴヌクレオチドであるアンチセンスDNAまたはアンチセンスRNAあるいは生体内でアンチセンスRNAを生成するDNA構築物等を使用できる。

【0036】本発明のペプチドは、錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤等として経口的に投与される。ペプチド医薬は、通常胃や小腸で分解されるので、経口投与の場合、これら臓器での分解を避けるための薬物運搬システムの使用が好ましい。また、本発明のペプチドは、水その他の薬剤として許容される液との無菌性溶液、懸濁剤などの注射剤等として非経口的に投与される。

【0037】本発明の医薬には、公知の担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤等が含まれる。また、錠剤、カプセル剤などに添加される結合剤、膨化剤、潤滑剤、甘味剤、香味剤等も公知のものを使用できる。本発明のペプチドの投与量は、患者の状態、患者の年齢、同時投与の有無、投与経路等によって異なるが、通常のペプチド医薬の投与量、即ち10 $\mu$ g/kg体重～8mg/kg体重の範囲にあると考えられる。

【0038】疾病にかかっている個体及び疾病にかかっていない個体との間のcDNAまたはゲノム配列の相違を決定することにより、本発明のペプチドの発現に関連した疾病を診断できる。すなわち、疾病にかかっている個体において観察される変異が、正常個体においては観察されない場合には、その変異は本発明のペプチドに関連した疾病の原因である可能性がある。また、上記したcDNAまたはmRNAの遺伝子異常を検出できるので、該ポリヌクレオチドの損傷、変異あるいは発現の低下あるいは増加、さらには発現過剰に由来する疾病を診断するための遺伝子診断に本発明のポリヌクレオチドあるいはその断片は有用である。本発明のポリヌクレオチドを治療薬あるいは予防薬として使用するに際しては、該ポリヌクレオチドを単独で、あるいは公知のレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター等に挿入し、公知の方法により投与することができる。

#### 【0039】

【実施例】以下に、実施例により本発明を更に具体的に説明するが、本発明は、その要旨を越えない限りこれらの実施例に限定されるものではない。特記しない限り、下記実施例の方法は、上記したSambrookらの実験マニュアルに記載された標準的な方法によって実施された。

#### 【0040】実施例1 ラットPKS遺伝子のクローニング

本発明のペプチド（以下、「PKS」と略す。）は、配列表の配列番号：2に示すアミノ酸配列を有し、配列表の配列番号：1に示すDNA配列によってコードされる。PKSの遺伝子は、例えば、以下に示すように、遺

伝子工学を用いてラット脳等の組織から得られる。

【0041】具体的には、まず、ラットより脳を取り出し、10倍量のグアニジンチオシアネートを含む溶液（4Mグアニジンチオシアネート、0.1Mトリス-塩酸、pH 7.5）中で、ポリトロンホモジナイザーを用い、ホモジナイズした。18Gの注射針のついた注射器を用いDNAを切断した後、終濃度が0.5%になるようにラウリルサルコシン酸ナトリウムを加え、CsCl-EDTA溶液（5.7M CsCl、0.5MEDTA、pH 7.5）の上に上層し、日立超遠心機RPS40ローター、25000 rpm、20度にて24時間遠心した。遠心チューブの底に沈殿したRNAを5ml程度のTES溶液（0.1% SDS、10mMトリス、pH 7.5、1mM EDTA）で溶解し、回収する。この液にクロロホルム/イソブタノール（=4:1）を等量加え夾雑物を除いた後、1/10量の3M酢酸ナトリウム（pH 5.2）及び2.5倍量のエタノールを加えて、RNAを沈殿させた。沈殿したRNAを遠心によって回収し、70%エタノールによって塩を除き、室温で乾燥させることによって、全RNAが得られた。得られた全RNAを1mlのカラム負荷緩衝液（20mMトリス-塩酸、pH 7.6、0.5M NaCl、1mMEDTA、0.1%ラウリルサルコシン酸ナトリウム）に溶かし、カラム負荷緩衝液で平衡化したオリゴdTセファロースにかけ、夾雑物を除くため10倍量のカラム負荷緩衝液で洗浄した後、溶出緩衝液（10mMトリス-塩酸、pH 7.6、1mMEDTA、0.05% SDS）で溶出するとmRNAが得られた。上記のようにして得られたmRNAの精製は、例えばInvitrogen社のFastTrack 2.0mRNA単離キットなどを用いても行うことができる。

【0042】得られたmRNA 1 $\mu$ gを11 $\mu$ lの水に溶かし、6塩基ランダムオリゴヌクレオチド（50ng/ $\mu$ l）を1 $\mu$ l加えて70℃、10分間加熱した後、氷上で1分間冷却し、10 $\times$ 第1鎖緩衝液（first strand buffer）（200mMトリス-塩酸、pH 8.4、500mMKCl）2 $\mu$ l、25mMMgCl<sub>2</sub> 2 $\mu$ l、0.1Mジチオトレイトール 2 $\mu$ l、10mMdNTP混合物（dATP、dGTP、dCTP、dTTP各10mM）1 $\mu$ lおよび逆転写酵素（GIBCO BRL社SuperScript II、200ユニット/ $\mu$ l）1 $\mu$ lを加え、25℃において10分間、42℃において50分間反応させるとラット海馬cDNAが合成された。上記したcDNAの合成は、Life Technologies社のキット（SuperScript Preamplication System for first strand cDNA Synthesis Kit）を用いて行った。

【0043】得られたcDNAを鋳型にして、配列番号3および4に示す合成DNAを用いて、ポリメラーゼ・チェーン・リアクション（PCR）法により、PKSのcDNAが得られた。まず、上記のようにして得られた

ラット脳cDNA 1 $\mu$ l、200 mMトリスー塩酸 (pH 8.4, 500mM KCl) 2.5 $\mu$ l、25mM MgCl<sub>2</sub> 1.5 $\mu$ l、10mM dNTP混合物 (dATP, dGTP, dCTP, dTTP各10mM) 0.5 $\mu$ l、上記配列番号3及び4の合成DNA (100 pmol/ $\mu$ l) 各0.5 $\mu$ l、PerkinElmer社のAmpliTaq DNAポリメラーゼ (5 ユニット/ $\mu$ l) 0.25 $\mu$ lおよび水18.25 $\mu$ lを加え、94℃80秒、55℃150秒、72℃180秒からなるサイクルを35サイクル繰り返すと、約200 bpのDNAが増幅された。このDNAを制限酵素EcoRI及びXhoIで切断した後、アカロースゲル電気泳動で分離し、制限酵素EcoRI及びXhoIで切断したpBluescript IIISK-ベクターにサブクローニングした。得られたDNAを大腸菌XL1-BlueMRF'株にトランスフォーマーし、クローンを100個得た。このクローンより、プラスミドDNAをminiprepプラスミド精製法 (プラスミドDNAの小規模調製法) で調製し、サンガー法によりDNA配列を決定したところ、うち1つに新規な配列が含まれていた。その配列を基に配列番号5から9に示すような合成DNAを作成し、Clontech社のMarathon RACEキットを用いて、配列番号5と6に示す合成DNAを順次使用して5'-RACE (cDNA末端の急速増幅) を行い、また配列番号7と8に示す合成DNAを順次使用して3'-RACEを行い、オープンリーディングフレーム全長をカバーするcDNA断片を得て、その塩基配列を決定したところ、配列番号1に示すような塩基配列が決定された。

【0044】PKSのcDNAは、以下のように、得られた塩基配列を基にして合成した配列番号9及び10に示すような合成DNAを用いても、簡単に得ることができた。すなわち、タカラPCRキットを用い、10X LA PCR緩衝液5 $\mu$ l、50 $\mu$ l、dNTP各100 $\mu$ M、合成DNA 各0.2 $\mu$ M、TAKARA LA Taq 1.25U、25 $\mu$ l、ラット海馬cDNA 1 $\mu$ l (約30 ng) の条件下で、PCR反応 (94℃、20秒、72℃、3分なるサイクルを5サイクル、94℃、20秒、70℃、3分からなるサイクルを5サイクルおよび94℃、20秒、68℃、3分からなるサイクルを20サイクル) を行うと、1500bpのPKSのcDNAが得られた。得られたPKSのcDNA 50 ngを制限酵素SpeI及びEcoRIにより切断し、同じくSpeI及びEcoRIにより切断したベクター (例えばストラタジーン社のpBluescript IISK-) 15 ngとTAKARA連結キット (Ligation Kit Iiver.2) を用いて連結した。得られたDNAに水を加えて100 $\mu$ lとし、7.5 M酢酸アンモニア1/2量、エタノール2倍量を加えてエタノール沈殿し、連結したDNAを精製後、2 $\mu$ lの水に溶解し、20 $\mu$ lの水に

懸濁した大腸菌XL1-BlueMRF'株へエレクトロポレーション法 (0.1 cm gap, 300 ohm, 1.75 kV, 25 $\mu$ FD, BIORad GenePulser II) で導入し、50 $\mu$ g/mlのアンピシリンを含むLB-Agar培地に播くと、PKSのcDNAが連結したプラスミドDNAを含有する大腸菌が生育した。この大腸菌よりプラスミドDNAをminiprep法で精製すると、PKSのcDNAを含むプラスミドベクターが得られた。このDNAの配列をサンガー法により決定した。

【0045】さらにPKSの動物細胞における発現系を構築した。上記のようにして得られたPKSのcDNAを鋳型とし、配列番号10および11に示す合成DNAを用いて、PCR反応を行い、得られたDNA断片を制限酵素XhoI及びEcoRIにより切断して、動物細胞用発現ベクターpEGFP-C2 (クローンテック社) に挿入することによりPKS動物細胞発現ベクターpEGFP-C2 PKSを作製した。得られたDNAを精製後、精製DNA 20 $\mu$ gをHeBS (20mM Hepes, pH 7.05, 137mM NaCl, 5mM KCl, 0.7mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 6mM デキストロース) 800 $\mu$ lに懸濁したCHOP細胞3 x 10<sup>6</sup> 個と混合して、エレクトロポレーション法 (0.4 cm gap, 0.38kV, 960 $\mu$ FD, BioRad GenePulser II) により、上記DNAをCHOP細胞に導入した。同細胞を $\alpha$  MEMにウシ胎児血清10%を加えた培地で2日間培養すると、細胞内に本発明のペプチドがクラゲ緑色蛍光タンパク質 (GFP) との融合蛋白として発現した。発現したタンパク質は、抗GFP抗体及び抗PKS抗体を用いたウェスタンブロットティングにより、75kDa (PKS約50kDa + GFP約27kDa) の位置に確認された。

【0046】上記したmRNA、cDNA及びDNAの合成、PCR、DNAの組み換え等の技術は、上記したSambrook等の実験室マニュアルに記載されている。PKSのmRNAの量を調べるために、以下のようにしてノーザンブロットを行った。得られたcDNAをランダムプライマーラベリング法によって32Pラベルし、マウスの脳、心臓、脾臓、肺、肝臓、骨格筋腎臓、精巣からそれぞれmRNAを調製し、ノーザンブロット解析をしたところ、PKSのmRNAは脳、心臓に最も多く、肝臓、腎臓、精巣、肺にも発現していた。このため、PKSはこれらの臓器で特異的な生理作用を有していると推察される。また、ラット脳において胎児期14日、胎児期18日、生後7日、生後15日、生後10週でのPKSの発現量をノーザンブロット解析で比較したところ、胎児期18日でPKSのmRNA量が最大になっていた。この時期は脳の発生段階において、神経細胞の増殖、分化、神経突起の伸展の時期に相当し、PKSはこれらの段階でなんらかの機能を有している可能性が示された。一方、以下のようにしてPKSに対する抗体を作製した。配列番号2の398-417番目の部分に相当す

る20残基のペプチドを合成し、Keyhole Limpet Hemocyanineにコンジュゲートして、ウサギに免疫した。初回免疫は0.4 mgをフロイント完全アジュバントと共にを行い、その後、1カ月ごとに2回目、3回目は0.4mgをフロイント不完全アジュバントと共に皮下に注射した。免疫して10日後に血液を採取し、抗PKS血清を得た。この抗血清を用いて、ラット脳のホモジネートのウェスタンブロットを行ったところ、約50 kDaの分子量を持つ蛋白質に抗PKS血清が特異的に結合したため、PKSはラットの生体内において約50 kDaの分子量を持つことが分かった。この分子量は配列番号2によって示されペプチドの分子量と一致していた。

【0047】本発明のペプチドは、配列番号2の60番目のGly, 62番目のGly, 65番目のGly, 71番目のAla, 73番目のLys, 172-170番目のHis-Asn, 194-196番目のAsp-Glu, 235-240番目のAsp-Glyにセリンスレオニンリン酸化酵素の共通配列を持っていることから、セリンスレオニンリン酸化酵素であると考えられる。またマウスのPKS遺伝子の配列は、配列番号2の254番目のGluがLysに、340番目のProがSerに、400番目のAlaがThrに変化しているだけなので、セリンスレオニンリン酸化酵素活性を持ち、かつ、配列番号2に示すような配列を持つペプチド及びそれをコードするDNA、及びそれらの配列の1以上の欠失、置換、挿入した配列を持つ哺乳類のペプチド及びこれをコードするDNAも本発明の範囲に含まれる。

【0048】本発明の蛋白質はその配列からセリンスレ

オニンリン酸化酵素であると考えられるので、リン酸化される基質の検索、リン酸化酵素活性に対する阻害剤及び活性化剤の開発などを行うことによって医薬への応用が期待される。また、mRNAの発現は、脳、心臓に最も多く、肝臓、腎臓、精巣、肺にも見られるため、これらの組織を原発とする病態に対する、病因の解明、診断、治療などに利用されることが期待される。また、本発明のペプチドは、中枢神経を調節する作用を有することが期待され、神経学的機能関連疾患の治療にも使用し得る。

#### 【0049】

【発明の効果】 本願発明のペプチドは、海馬に発現する、糖鎖情報伝達に関与するリン酸化酵素である。この酵素は、セリンスレオニンキナーゼに特徴的な配列およびプロリンリッチな配列とPPXP配列を有するのでSH3ドメインに結合するキナーゼであると考えられ、このペプチドをSH3-binding type protein kinase (PKS)と名付けた。ノーザンブロット解析の結果、PKSは、脳に最も多く存在し、胎児期に多く発現していることから、本願発明のペプチドは脳の構築において何らかの役割を果たしていると考えられる。従って、本発明のペプチドは、脳神経系疾患、神経学的機能関連疾患の治療・診断に有用であると考えられる。また、本発明のペプチドを活性化する物質は、神経活動の維持、活性化に有用であると考えられる。

#### 【0050】

#### 【配列表】

#### SEQUENCE LISTING

<:110>; Mitsubishi Chemical Corporation

<:120>; Novel mammalian peptide and polynucleotide coding therefor

<:130>; P98-0440

<:160>; 11

<:170>; PatentIn Ver. 2.0

<:210>; 1

<:211>; 1527

<:212>; DNA

<:213>; Wister Rat

<:220>;

<:221>; CDS

<:222>; (205)..(1455)

&lt;400&gt;; 1

```

acagegagat cctcttgeta acgagaagcc gcgggcgccc caaagcctcg ggacccgggc 60
gaccaaacc cttgcgacgc ctttcgcgc cctgctcatg gtggtggtgg tgcctgagc 120
ccctctcggg ccgggcagac gaagaccgac acggcgccca ggcctcctgc cgcggcgctcc 180
ccgcggcccc agcccaggga gaag atg agc gtg ggc tgc cct gag cct gaa 231
Met Ser Val Gly Cys Pro Glu Pro Glu
1 5
ccg etc cac tcc ctg cct tgc tgt ggg ccg ggg gcc gcc cct gta cct 279
Pro Leu His Ser Leu Pro Cys Cys Gly Pro Gly Ala Ala Pro Val Pro
10 15 20 25
ggt gca ggt gtg ccc etc etc aca gaa gac atg caa gcc ctg acc ctg 327
Gly Ala Gly Val Pro Leu Leu Thr Glu Asp Met Gln Ala Leu Thr Leu
30 35 40
cgc aca ctg gct gcc agc gac gtc acc aag cac tac gag etc gtg cgg 375
Arg Thr Leu Ala Ala Ser Asp Val Thr Lys His Tyr Glu Leu Val Arg
45 50 55
gag ctg ggt aaa ggg acc tac ggg aag gtc gac ctg gtg gct tac aag 423
Glu Leu Gly Lys Gly Thr Tyr Gly Lys Val Asp Leu Val Ala Tyr Lys
60 65 70
ggc aca ggc act aaa atg gcc ctg aaa ttt gtg aat aag agt aag acc 471
Gly Thr Gly Thr Lys Met Ala Leu Lys Phe Val Asn Lys Ser Lys Thr
75 80 85
aag ctg aag aac ttc ctg cgt gag gtg agc atc acc aac agc ctg tgc 519
Lys Leu Lys Asn Phe Leu Arg Glu Val Ser Ile Thr Asn Ser Leu Ser
90 95 100 105
tcl agc ccc ttc atc atc aag gtc ttc gac gtg gtc ttc gag acg gag 567
Ser Ser Pro Phe Ile Ile Lys Val Phe Asp Val Val Phe Glu Thr Glu
110 115 120
gag tgc tat gtc ttt gct cag gag tat gca cct gct ggg gac ctg ttt 615
Glu Cys Tyr Val Phe Ala Gln Glu Tyr Ala Pro Ala Gly Asp Leu Phe
125 130 135
gac atc atc cct cct cag gtc ggg etc ccg gag gac acg gtg aag cgc 663
Asp Ile Ile Pro Pro Gln Val Gly Leu Pro Glu Asp Thr Val Lys Arg
140 145 150
tgt gtg cag cag ctg ggg ctg gca ctg gac ttc atg cat agc agg cag 711
Cys Val Gln Gln Leu Gly Leu Ala Leu Asp Phe Met His Ser Arg Gln
155 160 165
ctg gtg cac cgc gac atc aag ccc gag aat gtg ctg ctg ttt gac cgt 759
Leu Val His Arg Asp Ile Lys Pro Glu Asn Val Leu Leu Phe Asp Arg
170 175 180 185
gag tgc cgc cgc gtg aag ctg gct gac ttc ggc atg acg cgg cgc gta 807
Glu Cys Arg Arg Val Lys Leu Ala Asp Phe Gly Met Thr Arg Arg Val
190 195 200
ggc tgc cgt gtg aag cga gta agc ggc act ata ccc tac acg gcg ccc 855
Gly Cys Arg Val Lys Arg Val Ser Gly Thr Ile Pro Tyr Thr Ala Pro
205 210 215
gag glg tgc cag gct ggc cgc gcc gat ggc ttc gcg gtg gac acg ggc 903
Glu Val Cys Gln Ala Gly Arg Ala Asp Gly Phe Ala Val Asp Thr Gly
220 225 230
glg gal glg tgg gca ttc ggc gtg etc atc ttc tgc gtg etc act ggc 951

```

Val Asp Val Trp Ala Phe Gly Val Leu Ile Phe Cys Val Leu Thr Gly  
 235 240 245  
 aac ttc ccg tgg gag gct gcg tca ggt gcc gat gcc ttc ttc gag gaa 999  
 Asn Phe Pro Trp Glu Ala Ala Ser Gly Ala Asp Ala Phe Phe Glu Glu  
 250 255 260 265  
 ttt gts cgc tgg cag cgg ggt cgc ctg ccc ggg ctg cca tcc cag tgg 1047  
 Phe Val Arg Trp Gln Arg Gly Arg Leu Pro Gly Leu Pro Ser Gln Trp  
 270 275 280  
 cga cgc ttt acg gag cct gct cta cgc atg ttc cag cgg ctt ctg gcg 1095  
 Arg Arg Phe Thr Glu Pro Ala Leu Arg Met Phe Gln Arg Leu Leu Ala  
 285 290 295  
 ctg gag cct gag cgg cgt ggg ccc gcc aag gag gtc ttt cgc ttc ctc 1143  
 Leu Glu Pro Glu Arg Arg Gly Pro Ala Lys Glu Val Phe Arg Phe Leu  
 300 305 310  
 aag cat gag ctc aca tct gag ctg cgg cgg cgg cca tcg cac cgc gca 1191  
 Lys His Glu Leu Thr Ser Glu Leu Arg Arg Arg Pro Ser His Arg Ala  
 315 320 325  
 cga aag cca cct ggg gac cgc ctg cct ggg ccc ctg cgc ctt gag gct 1239  
 Arg Lys Pro Pro Gly Asp Arg Leu Pro Gly Pro Leu Arg Leu Glu Ala  
 330 335 340 345  
 cca ggg cca ctc aag cgc act gtg ctc acc gag agt ggc agc ggc tcg 1287  
 Pro Gly Pro Leu Lys Arg Thr Val Leu Thr Glu Ser Gly Ser Gly Ser  
 350 355 360  
 cgg cct tcc cca ccc agc gta ggg ccc gtg gta ccc gtg cca gtg cca 1335  
 Arg Pro Ser Pro Pro Ser Val Gly Pro Val Val Pro Val Pro Val Pro  
 365 370 375  
 glg cca gta ccc gta cct gag gct ggt ctg gct cca ccc gca ccc ccg 1383  
 Val Pro Val Pro Val Pro Glu Ala Gly Leu Ala Pro Pro Ala Pro Pro  
 380 385 390  
 ggc agg acc gac ggc cgt gcg gac aag agc aaa ggg cag gtg gta ttg 1431  
 Gly Arg Thr Asp Gly Arg Ala Asp Lys Ser Lys Gly Gln Val Val Leu  
 395 400 405  
 gcc aca gcc atc gag atc tgc gtc tgagccgctg cagcacagct gttgcgggga 1485  
 Ala Thr Ala Ile Glu Ile Cys Val  
 410 415  
 agccgcgcgc tctaacccgt actagggaca aggagcagcc gc 1527

&lt;;210&gt;; 2

&lt;;211&gt;; 417

&lt;;212&gt;; PRT

&lt;;213&gt;; Wister Rat

&lt;;400&gt;; 2

Met Ser Val Gly Cys Pro Glu Pro Glu Pro Leu His Ser Leu Pro Cys  
 1 5 10 15  
 Cys Gly Pro Gly Ala Ala Pro Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Leu Leu  
 20 25 30  
 Thr Glu Asp Met Gln Ala Leu Thr Leu Arg Thr Leu Ala Ala Ser Asp  
 35 40 45  
 Val Thr Lys His Tyr Glu Leu Val Arg Glu Leu Gly Lys Gly Thr Tyr

50	55	60
Gly Lys Val Asp Leu Val	Ala Tyr Lys Gly Thr	Gly Thr Lys Met Ala
65	70	75
Leu Lys Phe Val Asn Lys Ser	Lys Thr Lys Leu Lys Asn Phe Leu Arg	
	85	90
Glu Val Ser Ile Thr Asn Ser	Leu Ser Ser Ser Pro Phe Ile Ile Lys	
	100	105
Val Phe Asp Val Val Phe Glu	Thr Glu Glu Cys Tyr Val Phe Ala Gln	
	115	120
Glu Tyr Ala Pro Ala Gly Asp	Leu Phe Asp Ile Ile Pro Pro Gln Val	
	130	135
Gly Leu Pro Glu Asp Thr Val	Lys Arg Cys Val Gln Gln Leu Gly Leu	
145	150	155
Ala Leu Asp Phe Met His Ser	Arg Gln Leu Val His Arg Asp Ile Lys	
	165	170
Pro Glu Asn Val Leu Leu Phe	Asp Arg Glu Cys Arg Arg Val Lys Leu	
	180	185
Ala Asp Phe Gly Met Thr Arg	Arg Val Gly Cys Arg Val Lys Arg Val	
	195	200
Ser Gly Thr Ile Pro Tyr Thr	Ala Pro Glu Val Cys Gln Ala Gly Arg	
	210	215
Ala Asp Gly Phe Ala Val Asp	Thr Gly Val Asp Val Trp Ala Phe Gly	
225	230	235
Val Leu Ile Phe Cys Val Leu	Thr Gly Asn Phe Pro Trp Glu Ala Ala	
	245	250
Ser Gly Ala Asp Ala Phe Phe	Glu Glu Phe Val Arg Trp Gln Arg Gly	
	260	265
Arg Leu Pro Gly Leu Pro Ser	Gln Trp Arg Arg Phe Thr Glu Pro Ala	
	275	280
Leu Arg Met Phe Gln Arg Leu	Leu Ala Leu Glu Pro Glu Arg Arg Gly	
	290	295
Pro Ala Lys Glu Val Phe Arg	Phe Leu Lys His Glu Leu Thr Ser Glu	
305	310	315
Leu Arg Arg Arg Pro Ser His	Arg Ala Arg Lys Pro Pro Gly Asp Arg	
	325	330
Leu Pro Gly Pro Leu Arg Leu	Glu Ala Pro Gly Pro Leu Lys Arg Thr	
	340	345
Val Leu Thr Glu Ser Gly Ser	Gly Ser Arg Pro Ser Pro Pro Ser Val	
	355	360
Gly Pro Val Val Pro Val Pro	Val Pro Val Pro Val Pro Val Pro Glu	
	370	375
Ala Gly Leu Ala Pro Pro Ala	Pro Pro Gly Arg Thr Asp Gly Arg Ala	
385	390	395
Asp Lys Ser Lys Gly Gln Val	Val Leu Ala Thr Ala Ile Glu Ile Cys	
	405	410
		415

Val

&lt;:210&gt;: 3

&lt;:211&gt;: 29

&lt;:212&gt;: DNA

&lt;:213&gt;: Artificial Sequence

<:220>:  
<:223>: Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<:400>: 3  
ggaattcayt gygayytnaa rcengaraa 29

<:210>: 4  
<:211>: 25  
<:212>: DNA  
<:213>: Artificial Sequence

<:220>:  
<:223>: Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<:400>: 4  
cclegagncac nacngaccac atrtc 25

<:210>: 5  
<:211>: 25  
<:212>: DNA  
<:213>: Artificial Sequence

<:220>:  
<:223>: Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<:400>: 5  
cttactcget tcacacggca gcta 25

<:210>: 6  
<:211>: 25  
<:212>: DNA  
<:213>: Artificial Sequence

<:220>:  
<:223>: Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<:400>: 6  
tcacgggtcaa acagcagcac attct 25

<:210>: 7  
<:211>: 32  
<:212>: DNA  
<:213>: Artificial Sequence

<:220>:  
<:223>: Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<:400>: 7

cctcgagtgt gctgctgttt gaccgtgagt gc 32

<210>: 8

<211>: 25

<212>: DNA

<213>: Artificial Sequence

<220>:

<223>: Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400>: 8

taggtgccg tgtgaagcga gtaag 25

<210>: 9

<211>: 37

<212>: DNA

<213>: Artificial Sequence

<220>:

<223>: Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400>: 9

gactagtga cagcgagatc ctcttgctaa cgagaag 37

<210>: 10

<211>: 37

<212>: DNA

<213>: Artificial Sequence

<220>:

<223>: Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400>: 10

ggaattcgcg gctgctcctt gtccctagta cgggtta 37

<210>: 11

<211>: 31

<212>: DNA

<213>: Artificial Sequence

<220>:

<223>: Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400>: 11

tctcgaggat gacgtgggc tgccctgagc c 31

【0051】

A

【配列表フリーテキスト】配列番号3-11:合成DN



## フロントページの続き

(51) Int. Cl.	識別記号	F I	テームト (参考)
C 1 2 Q 1/02		C 1 2 P 21/08	4 H 0 4 5
// C 1 2 P 21/08		C 1 2 N 5/00	B
(C 1 2 N 15/00)	Z N A		
C 1 2 R 1/01			
(C 1 2 N 9/12)			
C 1 2 R 1/01			

(72) 発明者 永井 克孝  
 東京都町田市南大谷11号 株式会社三菱化  
 学生命科学研究所内

F ターム (参考) 4B024 AA01 AA11 AA12 BA10 BA43  
 BA44 CA04 CA05 CA07 DA02  
 HA01  
 4B050 CC03 DD11 LL01  
 4B063 QA01 QA13 QA18 QQ03 QQ27  
 QR07 QR24 QS31 QS36  
 4B064 AG01 AG26 AG27 CA10 CA19  
 CC24 DA01 DA13  
 4B065 AA90X AA91Y AA93Y AB01  
 BA03 CA29 CA44 CA46  
 4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10  
 BA72 CA40 DA75 DA76 DA89  
 EA21 EA50 FA74

1